第 34 卷 第 3 期 昆虫学报 Vol. 34, No. 3
1991 年 8 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Aug., 1991

小地老虎变态期间马氏管超微结构与酯酶活性的变化*

陈长琨 王荫长 朱荣生** 尤子平

(南京农业大学植物保护系，南京 210014)

摘要 本实验用光镜和电镜观察了小地老虎 *Agrotis ypsilon* Rottemberg 幼虫在变态期间马氏管超微结构的变化及成虫马氏管的重组过程，同时还研究了变态期马氏管酯酶的活性。结果表明：(1) 变态期间马氏管外形完整，除至预蛹期隐肾复合体解体外，其余无明显变化。(2)变态期间管壁细胞变化显著。幼虫 6 龄末期马氏管细胞结构开始变化，主要特点为：细胞质电子密度高，充满了核糖体颗粒，微绒毛萎缩，线粒体从萎缩的微绒毛中退出进入细胞质，基膜内褶破坏。进入预蛹期幼虫马氏管细胞解体：基膜内褶、顶端微绒毛、线粒体及细胞质内的其它细胞器消失，并形成自体吞噬泡，细胞质内仅存细胞核及各种类型的液泡。但是在变态期间因底膜始终存在，故马氏管外形不变；至蛹后期，成虫马氏管细胞在原位重组，基膜内褶由浅变深，微绒毛由短变长，线粒体内嵴从无到有。(3) 变态过程中羧酸酯酶和酸性磷酸酯酶的活性变化趋势基本相同，以六龄幼虫最强，预蛹期次之，蛹期最低。

关键词 小地老虎 变态 马氏管 超微结构 酯酶

鳞翘目昆虫在幼虫经蛹期转变为成虫的过程中，马氏管的变化有两种形式：一种是幼虫马氏管的大部分外形不发生变化，仅隐肾复合体内的端段部分解体。如巢蛾 *Hyponomeuta* 和粉蝶 *Pieris* 幼虫；另一种是幼虫的马氏管全部解体，成虫的马氏管由"原始环"重新形成，如谷蛾 *Tineola* 和蜡螟 *Galleria* 幼虫 (Sehnal, 1985; Wigglesworth, 1972)。虽然在对美洲美人蕉弄蝶 *Calpodes ethlius* 幼虫马氏管的研究中，变态时外形上观察不到重大变化，但内部管壁细胞的变化十分激烈，组织发生解体和重组，并与蜕皮激素的作用有关 (Ryerse 1979、1980)。

作者曾对小地老虎 *Agrotis ypsilon* 幼虫和成虫马氏管的细微结构进行了详细研究。在此基础上，又着重观察了六龄末期幼虫和进入预蛹期后，马氏管组织学与细胞学的变化特征，以及自体吞噬泡和各种液泡的发生和形成过程。此外，还测定了不同发育时期酯酶活性的变化。这些结果可为研究激素类杀虫剂药理学提供组织学与细胞学依据。

材料和方法

一、供试昆虫的饲养与解剖

小地老虎采自野外的越冬代蛾经繁殖产卵，再在养虫室内累代饲养，以幼虫作试验

本文于 1989 年 5 月收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

** 南京农业大学电镜室。

用。幼虫在四龄以前群体饲养，饲以天然饲料；四龄以后用半人工饲料单头饲养。末龄幼虫移至锯木屑内化蛹。成虫喂以 10% 蔗糖水，饲养室温度 18—25℃，每日光照 10 小时。供试幼虫在生理盐水中解剖，取出马氏管备用。

二、光镜片的制作

试虫用 Bouin's 液固定，在不同梯度酒精中逐级脱水，用二甲苯透明后，石蜡包埋，切片厚度 5—7 微米。再经过苏木精-伊红双染。

三、电镜片的制作

试虫经活体解剖后取出马氏管。用 2% 戊二醛及 1% 锇酸双固定。用 Epon-812 包埋，切片厚度约 600 纳米，再用醋酸铀及柠檬酸铅染色。在 JEM-100CXII 型透射电镜观察。

四、酯酶活性的测定

1. 酶液制备　试虫在生理盐水中解剖，取出马氏管(除去隐肾复合体部分)。每10头幼虫的马氏管加生理盐水 1 毫升，用玻璃匀浆器匀浆，以 4000 转/分离心 15 分钟，取上清液测定。试验在 4℃ 水浴中进行。

2. 羧酸酯酶的活性测定　在试管中加入底物 5 毫升(含 3×10^{-4} mol/L 的 α-醋酸萘酯与 10^{-7} mol/L 的毒扁豆碱的 0.004 mol/L 磷酸缓冲液，pH 7.0)，再加入酶液 5—100 微升摇匀，置 25℃ 温浴中 30 分钟，立即加入显色剂 1 毫升(1% 固蓝盐 B 和 5% 十二烷基硫酸钠，两者按 2:5 混和)。半小时后，用 721 型分光光度计测 OD_{600} 值。在标准曲线上求出相应的 α-萘酚 mmol/L 的数值，计算酶活性(Van, 1962)。

3. 酸性磷酸酯酶活性的测定

在试管内加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 2 毫升 (pH4.9)。再加入作为底物的 0.001 mol/L 的磷酸苯二钠 1 毫升，酶液 300 微升，混匀后在 25℃ 下温浴 1 小时，然后加入 0.5 mol/L NaOH 1 毫升、0.5 mol/L $NaHCO_3$ 1 毫升、0.6% 氨基安替比林 1 毫升、2.4% 铁氰化钾 1 毫升，混匀后在 25℃ 下静置 1 小时。用 721 型分光光度计测 OD_{510} 值，在标准曲线上求出相应的苯酚含量，计算酶活性。

结果和分析

一、马氏管在幼虫发育和变态过程中的形态变化

小地老虎幼虫从四龄发育到六龄。在变态为蛹及羽化为成虫的过程中，马氏管外形的变化见表 1。

从表 1 中可以看出，马氏管长度和管径的增加，以六龄幼虫初期到中期为最快。至预蛹期，由于隐肾复合体的围膜解体，幼虫马氏管端段游离于血腔，管径缩小甚至消失，直到蛹期第 5 天才再度出现。在光镜下观察，马氏管的横切面中可见到细胞核的数量从四龄时的 4—6 个增加到五龄末期和六龄初期的 15—20 个，说明六龄中期马氏管的增长和发育是与五龄末期细胞增殖有关的。

二、末龄幼虫马氏管细胞变化的特征

幼虫进入预蛹之前，马氏管管壁细胞已开始发生一系列形态结构变化，在电镜下可以看到微绒毛萎缩、排列不整齐并互相交错，其中线粒体明显减少，外缘出现较多的核糖体。

表 1 小地老虎马氏管在变态过程中的外形变化

虫态及虫龄	马氏管色泽	管径(微米)		长度(毫米)	管 腔
		变 幅	平 均		
4 龄	乳白	35—50	47	20*	较小
5 龄(5 天)	乳白	38—60	50	46*	大
6 龄(1 天)	乳白	48—60	55	46*	大
6 龄(7 天)	乳白	72—101	83	59*	最大
预蛹	黄色	29—48	44	56	小或无
蛹(1 天)	黄色	38—55	43	55	小或无
蛹(5 天)	黄色	41—70	56	55	再现
成虫	乳白	60—84	71	54	增大

* 注：不含隐肾内的端段部分

基区内褶崩散，空隙增大，细胞质电子致密度极高，而且在顶区伸出“伪足”，突入管腔。“伪足”的形态变化很多，有的不分支，有的则呈树枝状，有的两伪足相对抱合成环。在“伪足”上还能伸出微绒毛，在微绒毛基部有较多的线粒体，中区内则无线粒体，说明变态开始之前，运输功能已经衰退，细胞开始更新重组。(图版 I：1、2)

三、化蛹期间的细胞学变化

从预蛹期开始，马氏管的底膜无明显变化，但管壁细胞层逐渐解体。从预蛹后期到蛹前期，顶区微绒毛和基区基膜内褶消失，核缩小，且呈异固缩，细胞内出现大量以“自体吞噬泡”为主的各种液泡，聚集在核的周围，能见到的其它细胞器很少。在光镜下观察，细胞与底膜分离，管腔近乎消失。(图版 I：3、4、5)

当蛹龄达 5 天，马氏管的细胞结构和管腔重现时，可以看出明显的细胞核，且分布均匀。基膜内褶不深，微绒毛短，内中无线粒体。随着蛹龄的增加，基膜内褶加深，顶端微绒毛伸长，细胞内充满各种液泡，分布均匀。液泡内含有针状晶体或颗粒，液泡膜外附着较多的核糖体。(图版 II：6、7、10)

至成虫期出现典型的成虫期细胞结构。其特点是具有复杂的液泡系，是变态过程中最显著的一个特征。在基本细胞中，液泡起始于预蛹期，形态多变，但它们与蛹期液泡最大的区别是多数液泡膜外缘核糖体极少或无(图版 II：8、9)。

至成虫后期，马氏管细胞出现功能性退变，即基膜内褶破坏，细胞质电子密度加大，微绒毛萎缩。

表 2 小地老虎变态期间马氏管的两种酯酶活性的变化

虫 态	羧 酸 酯 酶		酸性磷酸酯酶	
	活性(α-萘酚 mmol/L/ 头/分)	活性比*	活性(苯酚 μg/ 头/分)	活 性 比
幼虫(六龄)	18.30×10^{-3}	22	0.240	1.78
预蛹	4.70×10^{-3}	5.7	0.150	1.1
蛹(1 天)	0.83×10^{-3}	1	0.135	1
蛹(11 天)	2.10×10^{-3}	2.5	0.090	0.67

* 以蛹(1 天)酶活性为 1

四、变态期间马氏管羧酸酯酶与酸性磷酸酯酶活性的变化

在小地老虎幼虫的变态过程中，测定两种水解酶的活性（羧酸酯酶和酸性磷酸酯酶）结果见表 2。

从表 2 可见，两种水解酶在蛹龄 1 天以前，活性变化趋势基本相同，以单头计算，六龄幼虫为最高，预蛹期次之，蛹期较低，前期羧酸酯酶的变化幅度大于酸性磷酸酯酶。化蛹以后酸性磷酸酯酶的下降幅度较大。这些酯酶能否对杀虫剂起到降解和排泄作用，有待进一步研究。

讨　　论

1. 小地老虎成虫的马氏管是由幼虫的发育而成，成虫马氏管的外形与幼虫的相比较，除无隐肾复合体外，仅长度有所缩短，其余无明显区别。但从细胞学研究结果表明：成虫期的马氏管管壁细胞是由幼虫期细胞崩解后重新形成的。在此期间细胞核并没有消失，它们在细胞重组中起着重要作用，为成虫管壁细胞的产生提供遗传信息。预蛹期开始，细胞的基膜内褶、微绒毛和线粒体等细胞器消失，形成自体吞噬泡；至蛹中期这些细胞器才重新出现，及至预成虫期再进一步发育成熟，如微绒毛伸长，基内褶加深，线粒体内嵴再现等。Ryerse(1980) 认为，这些亚细胞结构的变化是受蜕皮激素控制的。

2. 成虫马氏管细胞内的液泡系是在幼虫期细胞崩解后发育至预蛹时开始出现的，进入蛹期不断增多，至成虫期开始排放。这种液泡有人称为薄片球体，其特征是膜外附有粗面内质网和核糖体（Wigglesworth 等，1962），其中含有 β-甘油酯酶等水解酶。另一种是同心圆的液泡，含有钙、镁、磷、硫、钾和氯等无机离子(Cheung 等，1973；Green，1979)。液泡膜外的核糖体至成虫期消失，是否由于此时马氏管已经发育完全，不再进行新的膜系的蛋白质合成所致，尚需进一步研究才能作出解释。

3. 多数液泡属于“自体吞噬泡”类型，内含物来自降解的线粒体、微绒毛、基膜内褶或其它细胞器等。这一现象说明了液泡系内贮存了大量的可被代谢物质。其中有用的物质可能在排除之前被再吸收利用；有的昆虫在管腔内的物质因受到水解酶的作用而形成尿液，最后排出代谢废物。通过酯酶活性测定，发现六龄幼虫期活性最高，这可能与虫体增大代谢旺盛有关，同时也反映出老熟幼虫具有较强的代谢能力。

4. 变态期间幼虫马氏管细胞的解体和成虫马氏管细胞的重组过程是与蜕皮激素的作用有关（Berendes 等，1971；Byers，1971；Bradley 等 1981）。因此马氏管细胞的形态变化与发生，可用来研究蜕皮激素的滴度变化与作用机制，或用来观察某些激素药剂的效应。将马氏管作离体培养的方法比较简单，其灵敏度必然超过常规生物检测法，值得今后在激素或激素类药剂的研究中探索。

参　考　文　献

Berendes, H. D. et al 1971 Ecdysone-related changes of the nuclear and cytoplasmic level of Malpighian tube cell in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 17: 2337—50.

Bradley, T. J. et al 1981 5-TH stimulated mitochondrial movement and microvillar growth in the Malpighian tubes of insect *Rhodonius plolixus*. *J. Cell Sci.* 49: 139—61.

Byers, J. R. 1971 Metamorphosis of the perirectal Malpighian tubes in the mealworm I. Histology and histo-

chemistry. *Canad. J. Zool.* 49: 823—32.
Cheung, W. W. K. et al 1973 Studies on water and ion transport in homopteran insects. *Tissue Cell* 5: 651—69.
Green, L. F. B. 1979 Regional specialization in the Malpighian tubules of the New Zealand glowworm (Diptera). *Tissue Cell* 11: 673—702.
Ryerse, J. S. 1979 Developmental changes in Malpighian tubule cell structure. *Tissue Cell* 11: 533—51.
Ryerse, J. S. 1980 The control of Malpighian tubule developmental physiology by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone. *J. Insect Physiol.* 26: 449—57.
Sehnal, F. 1985 Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Vol 2 pp 43—51.
Van Asperen, K. 1962 A study of housefly esterases by means of sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8: 401.
Wigglesworth, V. B. et al 1962 Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 8: 299—307.
Wigglesworth, V. B. 1972 The Principles of the Insect Physiology. pp 553—557. Chapman and Hall, London.

CHANGES OF ULTRASTRUCTURE AND ACTIVITIES OF ESTERASES OF BLACK CUTWORM MALPIGHIAN TUBULES DURING METAMORPHOSIS

CHEN CHANG-KUN WANG YIN-CHANG ZHU RONG-SHEN YOU ZI-PING
(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

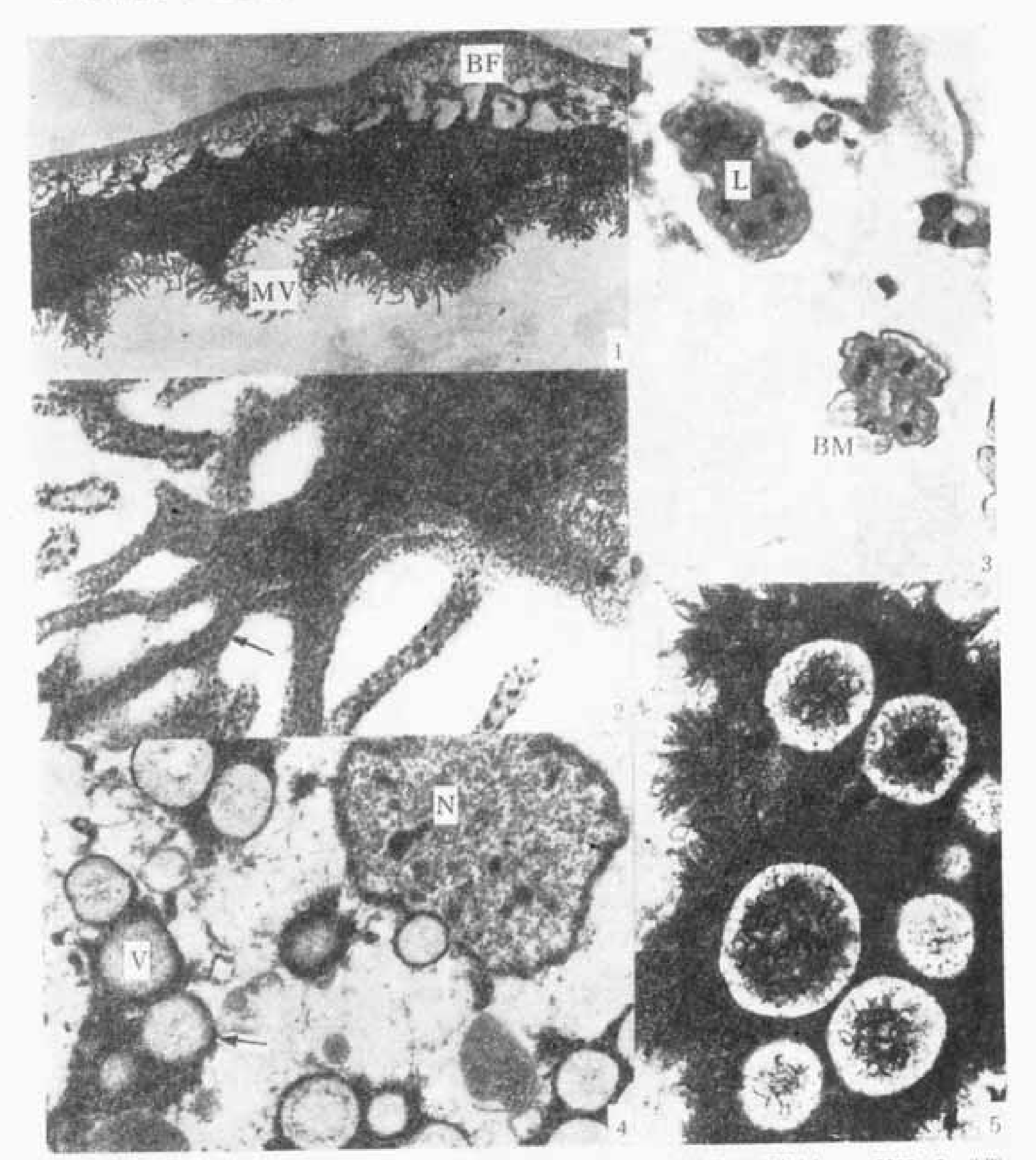
The morphological and ultrastructural changes of larval Malpighian tubules and the reconstruction of adult Malpighian tubules of black cutworm, *Agrotis ypsilon* (Rottemberg), during metamorphosis were studied with electron microscope. Activities of their esterases were also analysed with biochemical methods. The results are summarized as follows:

1. The external morphology of Malpighian tubules remained unchanged during prepupal and pupal stages, but that part of the tubule within the crytonephridial segment was dissociated owing to cryptohephridal membrane degeneration.

2. On the other hand, the cells of the Malpighian tubules changed dramatially in the late 6th instar. As revealed by electron micrographes the changes were as follows: electron density of cytoplasm increased, the basal infold disappeared, and microvilli shortened where the mitochondria retracted to cytoplasm. Cells of the larval Malpighian tubule degenerated during the prepupal and the early pupal stage: base infolds, microvilli, mitochondria and other organelles almost disappeared; autophagocytosis took place and the cytoplasm contained only various vesicles. But the basal lamina of Malpighian tubules persisted unchanged; therefore, the Malpighian tubules appeared intact. When the late pupal stage began, the adult Malpighian tubule cells were reconstructed at their original position; base infolds deepened; the length of microvilli increased; and mitochondria reappeared.

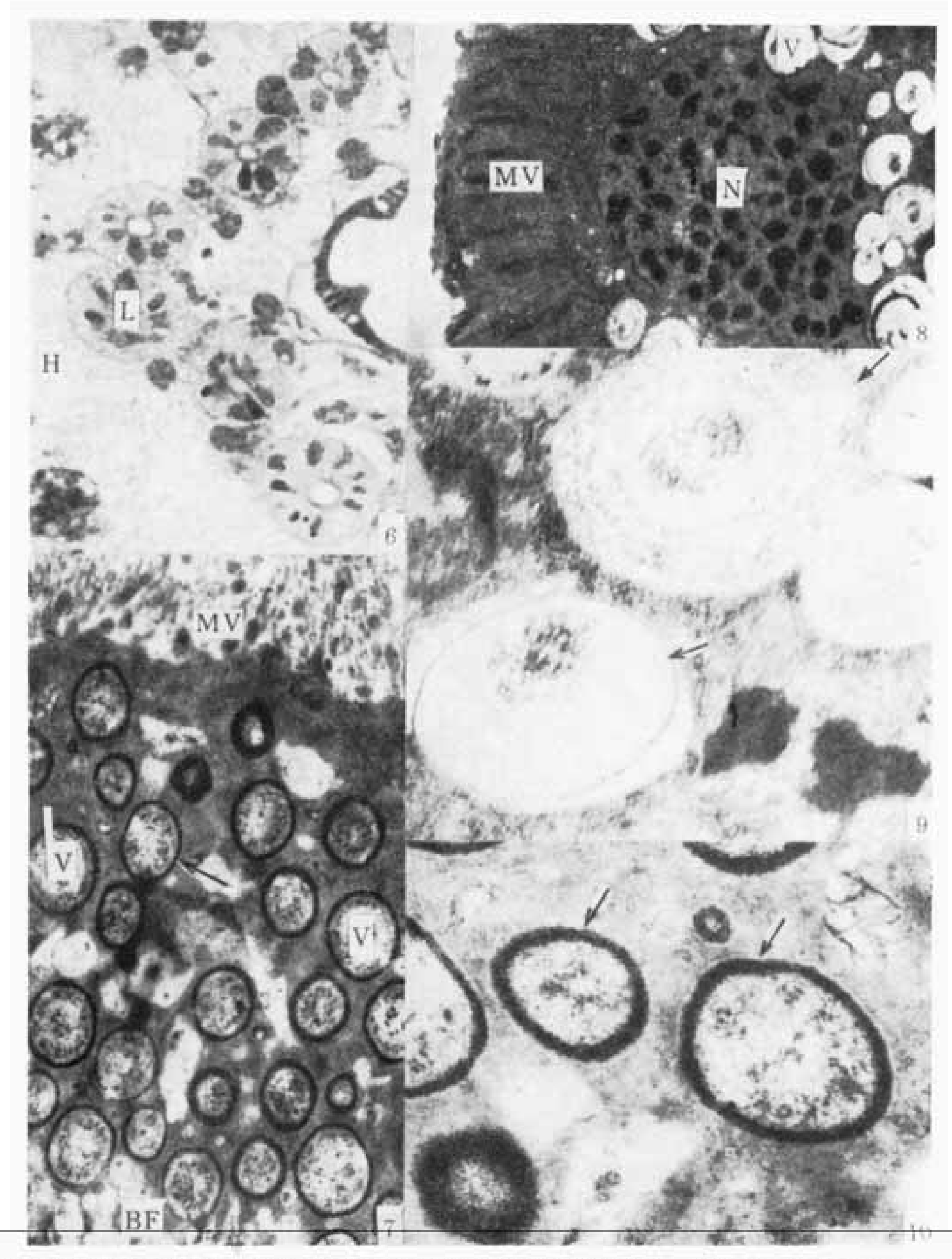
3. The esterase activities in Malpighian tubule were quite different at various periords during metamorphosis, and the activity sequence could be arranged as follows: 6th instar larvae > prepupae > pupae.

Key words *Agrotis ypsilon* (Rottemberg)——metamorphosis——Malpighian tubule——ultrastructure——esterase



1. 六龄末期马氏管细胞。示细胞质电子密度大，基膜内褶破坏，微绒毛萎缩及“伪足”形态。×2200　2. 为图1局部放大。示“伪足”上微绒毛内的核糖体颗粒(箭头)。×44000　3. 预蛹期马氏管横切面。示管腔极小或消失，底膜与细胞层分开。×350　4. 预蛹期细胞的微绒毛和基膜内褶消失，仅存核和多种液泡，液泡外具有核糖体颗粒(箭头)。×15000　5. 预蛹期细胞内含有针状结晶的液泡，并聚集成团。×20000

BF：基膜内褶；BM：底膜；MV：微绒毛；H：血腔；L：管腔；N：细胞核；V：液泡



6．蛹五天的马氏管横切面。示细胞开始重组，管腔重新出现底膜和紧连细胞层。×350　7．为图 6 局部放大。示均匀分布的液泡，其膜外布满核糖体颗粒(箭头)。×11000　8．成虫细胞内含有较多液泡，但液泡外核糖体颗粒极少或无。×6000　9．为图 8 局部放大。示液泡膜外无核糖体颗粒。×30000　10．为图 7 局部放大。示液泡膜外具核糖体颗粒。×30000